

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : A61K 38/44 // (A61K 38/44, 31:23) (A61K 38/44, 38:02)	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 96/21462 (43) Date de publication internationale: 18 juillet 1996 (18.07.96)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR96/00055 (22) Date de dépôt international: 12 janvier 1996 (12.01.96) (30) Données relatives à la priorité: 95/00309 12 janvier 1995 (12.01.95) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): EURO-PLANAIRE [FR/FR]; 361, avenue du Général-de-Gaulle, F-92140 Clamart (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): POSTAIRE, Eric [FR/FR]; 35, rue Aristide-Briand, F-92170 Vanves (FR). REGNAULT, Corinne [FR/FR]; 63, avenue Jean-Monet, F-92160 Antony (FR). ROCK-ARVEILLER, Monique [FR/FR]; 22, rue Charles-Gounod, F-91120 Palaiseau (FR). STELLA, Valérie [FR/FR]; Le Bois Fleuri, 80, allée des Marguerites, F-77410 Claye-Souilly (FR). BRACQ, Michel [FR/FR]; 14, Villa-des-Bois, F-92270 Bois-Colombes (FR). SAUZIERES, Jacques [FR/FR]; 81, rue de Paris, F-78470 Saint-Rémy-Les-Chevreuses (FR). (74) Mandataire: CABINET ORES; 6, avenue de Messine, F-75008 Paris (FR).		(81) Etats désignés: JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>
(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS COMPRISING A SUPEROXIDE DISMUTASE (54) Titre: COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES COMPRENANT UNE SUPEROXYDE DISMUTASE (57) Abstract New pharmaceutical compositions particularly well adapted to the oral administration of superoxide dismutases (SOD), by providing them a good bioavailability and a therapeutical efficiency. Said pharmaceutical compositions comprise essentially in combination a superoxide dismutase and at least one compound selected in the group comprised of lipids such as ceramids and proteins such as the prolamines and the polymer films based on said prolamines and optionally one or a plurality of pharmaceutically acceptable vehicles. (57) Abrégé Nouvelles compositions pharmaceutiques particulièrement bien adaptées à l'administration orale des superoxyde dismutases (SOD), en leur assurant une bonne biodisponibilité et une efficacité thérapeutique. Lesdites compositions pharmaceutiques comprennent essentiellement en combinaison, une superoxyde dismutase et au moins un composé sélectionné dans le groupe constitué par des lipides tels que les céramides et des protéines telles que les prolamines et les films polymériques à base desdites prolamines et éventuellement un ou plusieurs véhicules pharmaceutiquement acceptables.		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Brazil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Bélarus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovaquie
CM	Cameroon	LR	Libéria	SN	Sénégal
CN	Chine	LT	Lituanie	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LV	Lettonie	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	UG	Ouganda
FI	Finlande	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MR	Mauritanie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES COMPRENANT UNE SUPEROXYDE DISMUTASE.

La présente invention est relative à de nouvelles compositions pharmaceutiques particulièrement bien
5 adaptées à l'administration orale de la superoxyde dismutase (SOD), en lui assurant une bonne biodisponibilité et une efficacité thérapeutique.

Les superoxyde dismutases font l'objet, depuis leur caractérisation en 1968, par McCord et Fridovich (J.
10 Biol. Chem., 1969, 244, 6049-6055), d'études dans le traitement de nombreuses affections ; en effet, il s'agit d'une enzyme qui favorise l'élimination du radical superoxyde ($O_2^{\cdot -}$) par dismutation et constitue donc un système de protection contre les effets délétères de ce
15 radical, susceptible de se former *in vivo*, à partir de l'oxygène atmosphérique. Cette enzyme joue donc un rôle capital dans la prévention des effets toxiques qui pourraient résulter de l'exposition des cellules et de l'organisme à une atmosphère oxygénée où l'oxygène
20 (biradical) perd un électron célibataire (réduction).

Les radicaux libres étant impliqués dans de nombreuses affections, l'utilisation de la SOD en thérapeutique a donc été préconisée dans différents processus inflammatoires (rhumatismes, fibroses, notamment), viraux
25 (infection par le VIH notamment) et dans des conditions toxiques, liées à la présence d'oxygène en quantité importante (système nerveux central, ischémie, désordres gastro-intestinaux non vasculaires, désordres oculaires ou lutte contre les effets indésirables des traitements
30 anti-cancéreux) (Greenwald R.A., *Free Radical Biol. Med.*, 1990, 8, 201-209).

Les formes libres de SOD qui ont été testées, sont la Cu,Zn-SOD (origine végétale ou animale : bovine, rat ou humaine), la Mn-SOD (origine humaine, végétale,
35 algale), la Fe-SOD et les SOD recombinantes.

Les demi-vies plasmatiques des SOD natives sont très variables (de l'ordre de quelques minutes pour

la Cu,Zn-SOD ; de l'ordre de plusieurs heures pour la Mn-SOD, par exemple).

Pour augmenter la demi-vie plasmatique de ces SOD, différentes formes modifiées, pour l'administration parentérale ont été proposées ; on peut citer les SOD conjuguées au polyéthylène glycol (SOD-PEG), les SOD conjuguées à l'héparine (SOD-héparine), les SOD conjuguées à l'albumine (SOD-albumine) et les polymères ou copolymères de SOD et les SOD liposomales.

Toutefois ces différentes SOD ont l'inconvénient majeur d'être très peu absorbées lorsqu'elles sont administrées par voie orale.

En conséquence, la Demanderesse s'est donné pour but de mettre au point des formes galéniques aptes à permettre une absorption efficace de SOD par voie orale, une telle voie d'administration étant particulièrement intéressante pour la plupart des affections à traiter précitées.

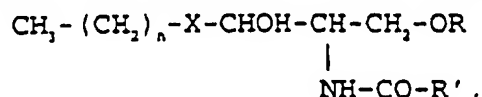
La présente invention a pour objet des compositions pharmaceutiques, caractérisées en ce qu'elles comprennent essentiellement en combinaison, une superoxyde dismutase et au moins un composé sélectionné dans le groupe constitué par des lipides et des protéines et éventuellement un ou plusieurs véhicules pharmaceutiquement acceptables, lesquelles compositions sont particulièrement bien adaptées à l'administration orale.

Selon un mode de réalisation avantageux desdites compositions, lesdits lipides sont sélectionnés parmi les lipides végétaux, de préférence dans le groupe constitué par les céramides, les phospholipides, les tylacoïdes et les diacylglycérols.

Selon un autre mode de réalisation avantageux desdites compositions, lesdites protéines sont sélectionnées parmi les protéines végétales, de préférence dans le groupe constitué par les prolamines et les films polymériques à base desdites prolamines.

Parmi les véhicules préférés, éventuellement associés, on peut citer les liposomes.

Selon un autre mode de réalisation avantageux de ladite composition, lesdits céramides (ou N-acyl sphingosines) sont d'origine synthétique, animale ou végétale, de préférence d'origine végétale, et sont des dérivés N-acyl acide gras de sphingosine de formule



10

dans laquelle

n est compris entre 5 et 15, de préférence entre 12 et 15,

X représente -CH=CH- ou -CHOH-,

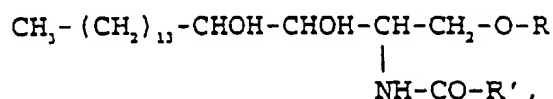
15 R représente un atome d'hydrogène ou un sucre (glucose, galactose) et

R' représente un groupement alkyle de C₁-C₁₀.

De manière avantageuse, lesdits céramides, d'origine végétale, sont de préférence issus de céréales (farines) et notamment du blé et présentent la formule

20

suivante :



25

dans laquelle

R représente un atome d'hydrogène ou un glucose,

R' a la même signification que ci-dessus.

De tels céramides végétaux (glycosylés ou non) peuvent notamment être obtenus conformément au procédé décrit dans la Demande Internationale PCT WO 92/00182, au nom des Laboratoires INOCOSM.

30

Selon un autre mode de réalisation avantageux desdites compositions, les prolamines sont de préférence d'origine végétale et peuvent être obtenues à partir de différentes céréales et notamment à partir du blé, du seigle, de l'orge, de l'avoine, du riz, du millet et du maïs, de préférence à partir du blé (gliadine) et sont de préférence des prolamines natives (c'est-à-dire non

35

dénaturées), issues soit de la farine, soit du gluten frais d'une des céréales précitées.

Selon encore un autre mode de réalisation avantageux desdites compositions, les films polymériques
5 à base de prolamine sont, de préférence, constitués par un polymère hydrophobe comprenant

- . au moins une prolamine d'origine végétale,
- . au moins un plastifiant choisi dans le groupe constitué par les hydrates de carbone, de préfé-
10 rence les polyols et les esters tels que phtalates, adipates, sébaçates, phosphates, citrates, tartrates et malates, le rapport prolamine:plastifiant étant compris entre 2:1 et 2:0,5 et

- . 5 à 30 % d'au moins un solvant choisi parmi
15 les monools, les diols et l'eau et

- en ce qu'ils sont susceptibles d'être obtenus par évaporation d'au moins une fraction de solvant présent dans une composition de départ qui comprend entre 40 et 80 % d'au moins une prolamine en solution dans un
20 solvant hydroalcoolique dont le titre en alcool est compris entre 40 et 80 % et au moins un plastifiant, le rapport plastifiant:solution alcoolique de prolamine étant compris entre 0,10:1 et 0,50:1, de préférence entre 0,20:1 et 0,23:1, jusqu'à l'obtention d'une solution
25 homogène plus ou moins épaisse.

De tels films polymériques, à base de prolamine, peuvent se présenter soit sous forme de gel, soit sous forme de film sec souple ou cassant, c'est-à-dire plus ou moins plastique, selon le degré
30 d'évaporation du solvant.

De manière inattendue, une composition conforme à l'invention est particulièrement bien adaptée à l'administration de SOD par voie orale, car elle augmente de manière significative la biodisponibilité de la
35 SOD, par rapport à celle obtenue, avec les compositions de SOD de l'Art antérieur.

Egalement de manière inattendue, la composition selon l'invention : SOD + film polymérique à base de prolamine (de préférence de la gliadine) :

- protège la SOD à pH acide (milieu gastrique)

5 et

- constitue une forme à libération prolongée.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en oeuvre du procédé objet de la présente invention ainsi qu'aux dessins annexés, dans lesquels :

- les figures 1 à 3 montrent les concentrations érythrocytaires obtenues après administration de différentes formes de SOD (libre, liposomale, conforme à l'invention : avec céramides), par voie sous-cutanée ;

- les figures 4 à 7 montrent les concentrations érythrocytaires obtenues après administration de différentes formes de SOD, par voie orale ;

- les figures 8 à 15 illustrent les résultats du traitement avec une composition selon l'invention (propriétés anti-inflammatoires obtenues après administration orale), sur le volume de l'oedème de la patte chez le rat (témoin de l'inflammation), en fonction de la quantité de SOD administrée ;

- les figures 16 et 17 illustrent la relation entre la quantité de SOD administrée par voie orale et l'effet anti-inflammatoire (pourcentage d'inhibition de la SOD en fonction du nombre de gavages) ; les oedèmes de la patte sont mesurés 4 h, 5 h et 6 h après les gavages.

- les figures 18 à 20 illustrent l'effet inhibiteur de SOD administrée par voie orale, sur l'activation des polynucléaires et l'augmentation significative de la biodisponibilité avec une composition selon l'invention.

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de

l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

EXEMPLE 1 : Composition conforme à l'invention : SOD + polymère à base de gliadine.

5 1. Méthode d'incorporation de la SOD dans la gliadine :

* Composition de la formule gliadine + SOD :

n°	Nom	Quantité
1	Solvant hydroalcoolique (50 % v/v d'éthanol)	18,25 ml
2	Sorbitol	1,575 g
3	Glycérol	0,675 g
4	Gliadine	4,5 g
5	SOD	1 ml

* solutions à : 4 mg/ml, 2 mg/ml, 1 mg/ml.

10 * Protocole de fabrication :

Dans un petit b cher placé dans un bain thermostaté à 40 C sous agitation mécanique, introduire le solvant hydroalcoolique. Puis ajouter dans l'ordre les composés 2, 3, 4, 5. Entre chaque addition, laisser agi-
15 ter jusqu'à dissolution complète des composés.

Le mélange est chauffé et agit  afin de diminuer les interactions hydrophobes gliadine-gliadine et donc d'augmenter la solubilité de la gliadine.

Le gly cerol est utilisé comme agent hydratant
20 et le sorbitol comme stabilisant et plastifiant. Le mélange obtenu est visqueux, collant et de coloration brunâtre.

2. Formulation du mélange obtenu en 1. :

Pour obtenir, par exemple, une composition
25 selon l'invention sous la forme de comprimés, on étale le mélange pâteux obtenu sur un support approprié (support en téflon, en polypropylène, en verre ou en acier inoxydable), on évapore le solvant, soit à 24 C et à un taux d'humidité relative de 60 %, pendant environ une quaran-
30 taine d'heures, soit à 60 C et à un taux d'humidité relative de 2 %, pendant une vingtaine d'heures, soit à

37°C : une lampe est placée à 20 cm du film pendant quelques heures (2-10 h).

On obtient un film sec qui est ensuite découpé et pulvérisé de manière à permettre la préparation de comprimés.

EXEMPLES 2 ET 3 :

	Formulation (m/m)	Taille des particules (nm)	Poly- disper- sité	Pourcentage d'encapsu- lation de la SOD
EXEMPLE 2 (SOD + liposomes)	DSPC/CHO/ stéarylamine/- (14/7/4/0)	234	3	36,2 %
EXEMPLE 3 (SOD + céramides à différentes concentra- tions) :	DSPC/CHO/ stéarylamine/ CV (14/7/4/1)	244	4	48,2 %
	DSPC/CHO/sté- arylamine/CV (14/7/4/4)	258	3	36,5 %
	DSPC/CHO/sté- arylamine/CV (14/7/4/7)	241	3	31,9 %
	DSPC/CHO/sté- arylamine/CV (14/7/4/14)	269	4	26,6 %

Dans ce tableau, l'abréviation DSPC signifie distéaroyl phosphatidyl choline, l'abréviation CHO signifie cholestérol et l'abréviation CV signifie céramide végétal.

L'exemple 2 correspond à une composition de l'Art antérieur ; l'exemple 3 correspond à une composition conforme à l'invention SOD + céramides, encapsulée pour une part importante dans des liposomes (DSPC/CHO/stéarylamine).

Les liposomes sont obtenus conformément au procédé décrit dans la Demande européenne 0 274 961 ou la Demande européenne 0 349 429 et présentent une bonne homogénéité, comme le montre la colonne polydispersité.

EXEMPLE 4 : Etude pharmacocinétique comparée après administration par voie sous-cutanée et par voie orale de compositions à base de SOD.

La cinétique de la SOD plasmatique est analysée chez le rat anesthésié après administration par voie orale ou sous-cutanée de SOD libre, de SOD liposomale ou de SOD sous la forme d'une composition selon l'invention.

- Matériel :

*** Animaux :**

Les rats utilisés sont des rats mâles OFA, Sprague-Dawley, dénués de germes pathogènes, pesant de 300 à 400 g, non co-sanguins (élevage IFFA CREDO). Ils sont conservés 3 semaines après leur arrivée à l'animalerie afin d'éviter tout stress lié au changement d'environnement et sont soumis à une diète hydrique 16 à 18 heures avant l'expérience.

*** Matériel utilisé :**

. Seringues plastiques graduées à usage unique de 5 ml, pour le gavage (1 par dose), l'injection sous cutanée ainsi que pour l'anesthésie,

. Seringues de 1 ml pour l'anesthésie,

. Canules de gavage 85/14 droite (1 par dose),

. Aiguille 25/0,5 à usage unique, pour l'anesthésie,

. Cristallisoirs pour l'isolement des rats pendant l'endormissement,

. Petit matériel chirurgical pour cathérisation :

cathéters PE50 (Becton-Dickinson)

canules trachéales pour aide respiratoire
robinets 1 voie (Vygon).

*** Solution anesthésiante :**

L'anesthésiant utilisé est du thiopental (Nesdonal®). Il est administré à raison de 50 mg/kg de poids de rat.

La solution est préparée extemporanément.

- * Solution héparinée :
PVP (polyvinylpyrrolidone) hépariné 500 mg/ml
+ 200 UI d'héparine dans NaCl 0,9 %.
- * Solutions utilisées pour l'étude :
- 5 . Voie orale :
 - SOD érythrocytaire bovine (Allerbiодose®) :
1-2-4 mg/ml, dans du NaCl 0,9 %,
 - NaCl 0,9 % (témoin),
 - SOD érythrocytaire bovine 1-2-4 mg/ml +
10 céramides végétales 1 % (Inocosm), dans du NaCl 0,9 %, selon l'invention,
 - céramides végétales 1 % dans du NaCl 0,9 % (témoin),
 - SOD érythrocytaire bovine 1-2-4 mg/ml lipo-
15 somale,
 - liposomes (témoin),
 - gliadine extraite du blé (témoin),
 - SOD érythrocytaire bovine + gliadine selon l'invention.
- 20 . Voie sous-cutanée :
 - SOD érythrocytaire bovine (Allerbiодose®)
0,5-1-2 mg/ml, dans du NaCl 0,9 %,
 - NaCl 0,9 % (témoin),
 - SOD érythrocytaire bovine 0,5-1-2 mg/ml +
25 céramides végétales 1 % (Inocosm), dans du NaCl 0,9 % selon l'invention,
 - céramides végétales 1 % dans du NaCl 0,9 % (témoin),
 - SOD érythrocytaire bovine 0,5-1-2 mg/ml
30 liposomale,
 - liposomes (témoin),
 - SOD érythrocytaire bovine + gliadine selon l'invention.
- Méthode :
- 35 * Traitements préalables des animaux :
 - . par voie orale : gavage

Le gavage des animaux (n=4) est réalisé à T0 par un volume de 1 ml de solution ou suspension à étudier, dans une solution de NaCl à 0,9 %. Ce gavage est effectué à l'aide d'une canule montée sur une seringue de 5 1 ml et introduite dans la cavité buccale du rat.

. par voie sous-cutanée :

L'injection des solutions ou suspensions à étudier est réalisée à T0 par administration d'un volume de 0,3 ml (dans une solution de NaCl à 0,9 %), derrière 10 la tête de l'animal (n=4).

Chaque série d'expérience est réalisée sur 4 animaux par dose. Les groupes témoins étant toujours traités en parallèle pour chaque expérimentation.

* Cathérisation de la carotide :

15 Le gavage (ou l'injection sous cutanée) des animaux, une fois réalisé, ces derniers sont anesthésiés par injection lente de thiopental, par voie intra-péritonéale (0,1 ml/100 g).

Lorsque l'animal dort, il est placé sur le dos 20 afin de procéder à la cathérisation de la carotide. Pour cela, la peau est découpée soigneusement au niveau du cou de l'animal à l'aide d'une paire de ciseaux.

Les muscles sont écartés à l'aide d'une pince afin de laisser libre accès à la carotide.

25 Cette dernière est dégagée, puis clampée côté coeur, et ligaturée côté tête, à l'aide d'un fil fin. Une légère incision de la carotide est alors réalisée à l'aide d'une paire de ciseaux, permettant l'insertion d'un cathéter (sur 1,5 cm environ) monté sur une aiguille 30 équipée d'un robinet une voie. Le cathéter est maintenu en place par une seconde ligature côté coeur. Il est ensuite hépariné à l'aide de la solution héparinée, afin d'éviter toute coagulation du sang lors des prélèvements successifs.

35 Une compresse de solution de NaCl à 0,9 % est alors posée sur la plaie afin d'éviter un dessèchement excessif de celle-ci.

Pendant toute la durée de l'expérience, les animaux sont placés sous deux lampes afin d'être réchauffés.

* Prélèvements sanguins :

5 Les prélèvements sont effectués toutes les heures pendant 6 heures (400 µl), à l'aide du robinet une voie. Le sang est recueilli dans des tubes Eppendorf héparinés (20 µl d'héparine 1 000 UI/ml). Il est ensuite centrifugé 5 min à 4 000 trs/min. Le plasma est alors
10 éliminé et remplacé par du NaCl à 0,9 %. Les tubes sont de nouveau centrifugés 5 min à 4 000 trs/min. Trois lavages successifs des globules rouges sont ainsi réalisés.

* Dosages érythrocytaires : mesure de l'activité SOD :

15 Les dosages de l'activité enzymatique de la SOD érythrocytaire (de chacune des formes) sont réalisés sur chaque prélèvement témoins ou traités.

Une dilution adéquate des hématies est réalisée dans de l'eau distillée (+ 0,5 ml d'une solution de
20 triton à 1 %) afin d'obtenir pour le tube essai une inhibition d'environ 50 % par rapport au tube témoin.

Les résultats obtenus en UI de SOD/ml sont rapportés en UI de SOD/mg d'hémoglobine. Le dosage de l'hémoglobine est réalisé par spectrophotométrie à
25 405 nm.

- Résultats :

Les résultats des cinétiques érythrocytaires de la SOD administrée par voie sous-cutanée sont présentés aux figures 1-3 :

- 30 - la figure 1 correspond aux concentrations érythrocytaires obtenues avec la SOD libre,
- la figure 2 correspond aux concentrations érythrocytaires obtenues avec la SOD liposomale,
- la figure 3 correspond aux résultats obtenus
35 avec une composition conforme à l'invention : SOD + céramides.

Les résultats des cinétiques érythrocytaires de la SOD administrée par voie orale sont présentés aux figures 4-7 :

- la figure 4 correspond aux concentrations érythrocytaires obtenues avec la SOD libre,
- la figure 5 correspond aux concentrations érythrocytaires obtenues avec la SOD liposomale,
- la figure 6 correspond aux concentrations érythrocytaires obtenues avec une composition conforme à l'invention SOD + céramides et
- la figure 7 correspond aux concentrations érythrocytaires obtenues avec une composition conforme à l'invention SOD + gliadine.

Les Tableaux indiquent les données cinétiques obtenues pour les différentes courbes présentées.

TABLEAU I

AUC des courbes de cinétiques érythrocytaires chez le rat, après administration par voie sous-cutanée.

Courbes cinétiques	Concentrations	AUC (Ul.h.mg ⁻¹ d'Hb)
SOD	0,5 mg/ml	42,36
	1,0 mg/ml	59,02
	2,0 mg/ml	80,88
SOD liposomale (exemple 2)	0,5 mg/ml	62,90
	1,0 mg/ml	93,69
	2,0 mg/ml	118,73
SOD + céramides (exemple 3)	0,5 mg/ml	62,28
	1,0 mg/ml	91,86
	2,0 mg/ml	116,75

quantité administrée 0,3 ml.

TABLEAU II
AUC des courbes de cinétiques érythrocytaires
chez le rat, après administration par voie orale

5	Courbes ciné- tiques	Concentrations (mg/ml)	AUC (Ul.h.mg-1 d'Hb)	F' (biодispo- nibilité rela- tive/SC)
	SOD	1,0	2,13	0,05
		2,0	7,97	0,13
		4,0	12,09	0,15
10	SOD liposomale (exemple 2)	1,0	9,90	0,16
		2,0	17,24	0,18
		4,0	25,87	0,22
	SOD+céramides (exemple 3)	1,0	45,43	0,73
		2,0	52,16	0,56
		4,0	61,01	0,52
	SOD + gliadine (exemple 1)	1,0	>20	ND
		2,0	>50	ND
		4,0	>100	ND

15 ND = non déterminable.

5) Conclusion :

* Voie sous-cutanée :

Les T_{max} se situent vers 5 heures pour les 4 formes de SOD.

20 Les C_{max} sont légèrement plus faibles pour la forme libre, et identiques pour la forme liposome et avec céramides.

Les C_{max} obtenus avec la SOD + gliadine sont :
6,52 pour une concentration de 25 µg/ml, 7,48 pour une
25 concentration de 50 µg/ml et 65,68 pour une concentration de 100 µg/ml.

* Voie orale :

Les T_{max} se situent vers 5 heures pour la SOD libre et les compositions selon les exemples 2 et 3,
30 alors que la formulation à base de gliadine (exemple 1) à un T_{max} supérieur à 6 h.

Les C_{max} sont plus faibles pour la forme libre, intermédiaires pour la forme liposomale (exemple 2) et supérieurs pour la forme avec céramides ou gliadine
35 (exemples 1 et 3).

La SOD passe donc à fortes concentrations, par voie orale, et son passage est significativement favorisé lorsqu'une composition selon l'invention est utilisée.

**EXEMPLE 5 : PROPRIETES ANTI-INFLAMMATOIRES DE LA
5 SUPEROXYDE DISMUTASE PAR VOIE ORALE.**

A. Oedème de la patte.

1) But de l'étude :

Etudier les cinétiques comparées d'action anti-inflammatoire d'une forme libre de SOD et d'une
10 composition selon l'invention, à différentes concentrations.

2) Solutions ou suspensions étudiées (voir exemple 4) :

- * SOD libre
- 15 * Témoin NaCl
- * SOD + céramides (selon l'exemple 3)
- * Témoin céramides

3) Technique :

* Traitement des animaux par la SOD :
20 Gavage des animaux à l'aide d'une canule montée sur une seringue de 0,5 ml insérée dans la cavité buccale du rat, comme décrit à l'exemple 5.

2 gavages sont réalisés par jour (le matin et le soir).

25 * Induction de l'oedème :

Injection de 0,1 ml de carragénine λ à 1 % dans le coussinet de la patte.

*** Mesures du volume de la patte :**

Les mesures sont réalisées toutes les heures
30 durant 6 heures.

Les figures 8 à 15 illustrent les résultats du traitement avec une composition selon l'invention (propriétés anti-inflammatoires) sur le volume de l'oedème de la patte chez le rat (témoin de
35 l'inflammation), en fonction de la quantité de SOD administrée :

- la figure 8 correspond aux résultats obtenus avec 0,5 mg/kg de SOD (2 gavages),

- la figure 9 correspond aux résultats obtenus avec 0,5 mg/kg de SOD (4 gavages),

5 - la figure 10 correspond aux résultats obtenus avec 0,5 mg/kg de SOD (6 gavages),

- la figure 11 correspond aux résultats obtenus avec 0,5 mg/kg de SOD (8 gavages),

10 - la figure 12 correspond aux résultats obtenus avec 5 mg/kg de SOD (2 gavages),

- la figure 13 correspond aux résultats obtenus avec 5 mg/kg de SOD (3 gavages),

- la figure 14 correspond aux résultats obtenus avec 5 mg/kg de SOD (4 gavages), et

15 - la figure 15 correspond aux résultats obtenus avec 20 mg/kg de SOD (2 gavages).

Les figures 16 et 17 illustrent, dans le cadre du même protocole, le pourcentage d'inhibition de la SOD en fonction du nombre de gavages :

20 - la figure 16 correspond au pourcentage d'inhibition obtenu avec 0,5 mg/kg de SOD,

- la figure 17 correspond au pourcentage d'inhibition obtenu avec 0,5 mg/kg de SOD + céramides.

25 Les résultats obtenus montrent l'intérêt de l'encapsulation de la SOD pour une activité pharmacologique par voie orale même si une action anti-inflammatoire est démontrée aux mêmes doses à partir de 4 ou 6 gavages pour la SOD libre.

La forme encapsulée de SOD présente toujours
30 un effet anti-inflammatoire, quelque soit le nombre de gavages.

B. Etude de l'activation des polynucléaires.

1) But de l'étude :

comparer l'effet inhibiteur de différentes
35 formes de SOD sur l'activation des polynucléaires.

2) Solutions ou suspensions étudiées :

Mêmes solutions ou suspensions que dans l'Exemple 5 A..

3) Technique :5 * Prélèvements :

les prélèvements sont ceux recueillis 3 heures après la pleurésie.

* Dosage :

10 - Témoin réactif : PBS^{*} (0,65 ml) + cytochrome C 5 mg/ml (0,15 ml).

- Témoin cellule : PBS^{*} (0,65 ml) + cytochrome C 5 mg/ml (0,15 ml) + PN 10 M/ml (0,2 ml).

15 - Essai : PBS^{*} (0,45 ml) + cytochrome C 5 mg/ml (0,15 ml) + ZO ou PMA (0,2 ml), avec : Témoin NaCl (colonne 1), SOD (colonne 2), Témoin céramides (colonne 3), SOD + céramides (colonne 4), Témoin liposomes (colonne 5), SOD liposomale (colonne 6).

- Incuber 15 minutes au bain marie à 37°C sous agitation,

20 - arrêter la réaction 10 minutes dans un bain de glace,

- centrifuger 5 minutes à 2 000 trs/min.

4) Résultats :

25 Les figures 18 à 20 illustrent les résultats obtenus :

- la figure 18 montre la production d'anions superoxydes par les polynucléaires après stimulation,

30 - la figure 19 montre la production d'anions superoxydes par les polynucléaires après stimulation par le zymosan (technique spectrophotométrique),

- la figure 20 montre la production d'anions superoxydes par les polynucléaires après stimulation par le PMA (technique spectrophotométrique).

35 Les résultats montrent de manière significative le rôle antiinflammatoire par voie orale de la SOD libre ($P < 0,05$), encapsulée par des liposomes ($P < 0,07$) et encapsulée dans des céramides ($P < 0,001$).

La figure 17 démontre qu'à la dose de 0,5 mg/kg, l'effet anti-inflammatoire de la SOD libre est observé à partir de 4 gavages ; alors que les résultats de la figure 18 démontrent un effet anti-inflammatoire de la SOD encapsulée dans des céramides dès le second
5 gavage.

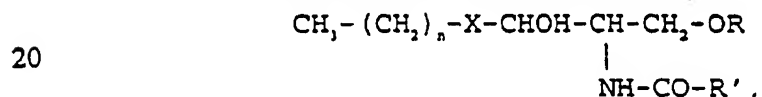
Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en oeuvre, de réalisation et d'application qui vien-
10 nent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarter du cadre, ni de la portée de la présente invention.

REVENDICATIONS

1°) Compositions pharmaceutiques, caractérisées en ce qu'elles comprennent essentiellement en combinaison, une superoxyde dismutase et au moins un composé sélectionné dans le groupe constitué par des lipides et des protéines et éventuellement un ou plusieurs véhicules pharmaceutiquement acceptables.

2°) Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce que lesdits lipides sont sélectionnés dans le groupe constitué par les céramides, les phospholipides, les tylacoïdes et les diacylglycérols et en ce que lesdites protéines sont sélectionnées dans le groupe constitué par les prolamines et les films polymériques à base desdites prolamines.

3°) Composition selon la revendication 2, caractérisée en ce que lesdits céramides (ou N-acyl sphingosines) sont d'origine végétale et sont des dérivés N-acyle acide gras de sphingosine de formule



dans laquelle

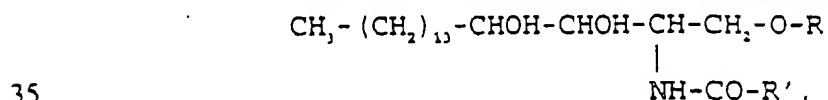
n est compris entre 5 et 15, de préférence entre 12 et 15,

X représente -CH=CH- ou -CHOH-,

R représente un atome d'hydrogène ou un sucre (glucose, galactose) et

R' représente un groupement alkyle de C₁-C₁₀.

4°) Composition selon la revendication 3, caractérisée en ce que lesdits céramides, d'origine végétale sont de préférence issus de céréales (farines) et notamment du blé et présentent la formule suivante :



dans laquelle

R représente un atome d'hydrogène ou un glucose,

R' a la même signification que ci-dessus.

5°) Composition selon la revendication 2, caractérisée en ce que lesdites prolamines sont d'origine végétale et sont issues de différentes céréales choisies dans le groupe constitué par du blé, du seigle, de
5 l'orge, de l'avoine, du riz, du millet et du maïs.

6°) Composition selon la revendication 1, caractérisé en ce que les films polymériques à base de prolamine sont, de préférence, constitués par un polymère hydrophobe comprenant

10 . au moins une prolamine d'origine végétale,
 . au moins un plastifiant choisi dans le groupe constitué par les hydrates de carbone, de préférence les polyols et les esters tels que phtalates, adipates, sébaçates, phosphates, citrates, tartrates et
15 malates, le rapport prolamine:plastifiant étant compris entre 2:1 et 2:0,5 et

 . 5 à 30 % d'au moins un solvant choisi parmi les monools, les diols et l'eau et

 - en ce qu'ils sont susceptibles d'être obtenus par évaporation d'au moins une fraction de solvant présent dans une composition de départ qui comprend entre 40 et 80 % d'au moins une prolamine en solution dans un solvant hydroalcoolique dont le titre en alcool est compris entre 40 et 80 % et au moins un plastifiant, le
25 rapport plastifiant:solution alcoolique de prolamine étant compris entre 0,10:1 et 0,50:1, de préférence entre 0,20:1 et 0,23:1, jusqu'à l'obtention d'une solution homogène plus ou moins épaisse.

7°) Composition selon l'une quelconque des
30 revendications 1 à 6, destinée à une administration par voie orale.

8°) Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisée en ce qu'elle comprend en tant que véhicules associés, des liposomes.

35 9°) Utilisation d'une composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, pour la préparation

d'un médicament destiné au moins au traitement de l'inflammation.

1/17

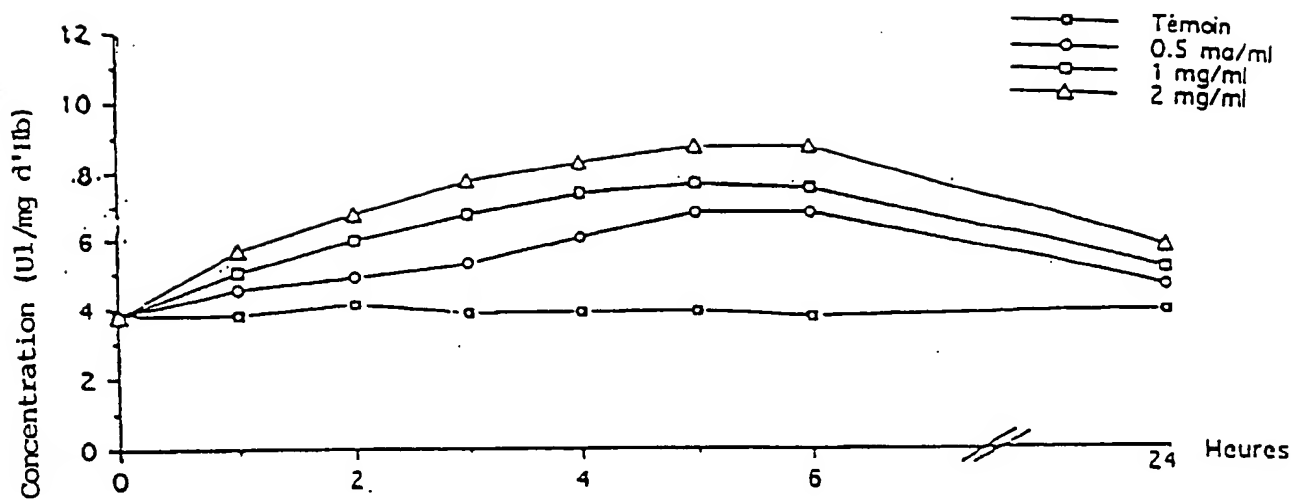


FIGURE 1

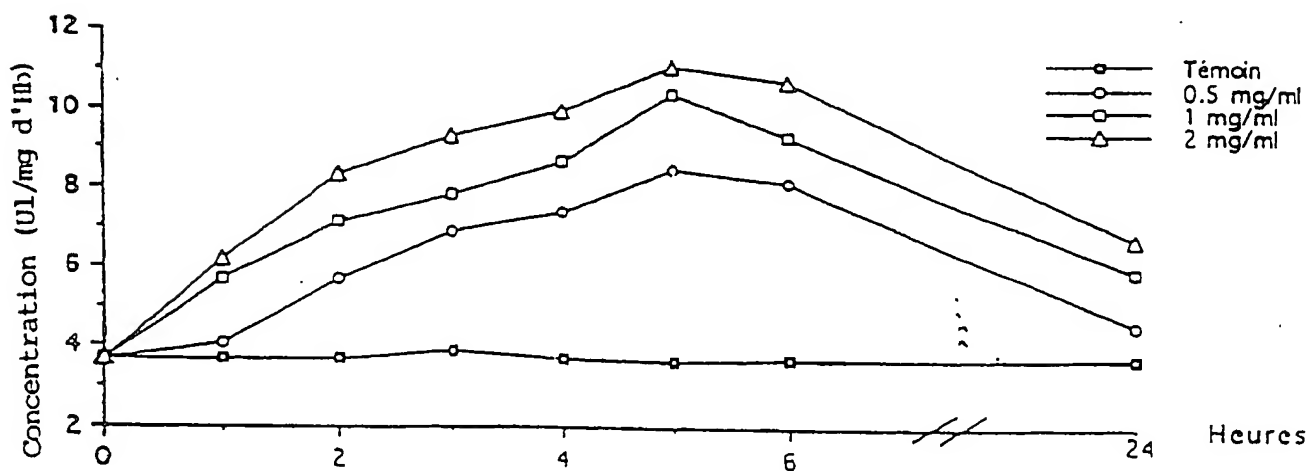


FIGURE 2

2/17

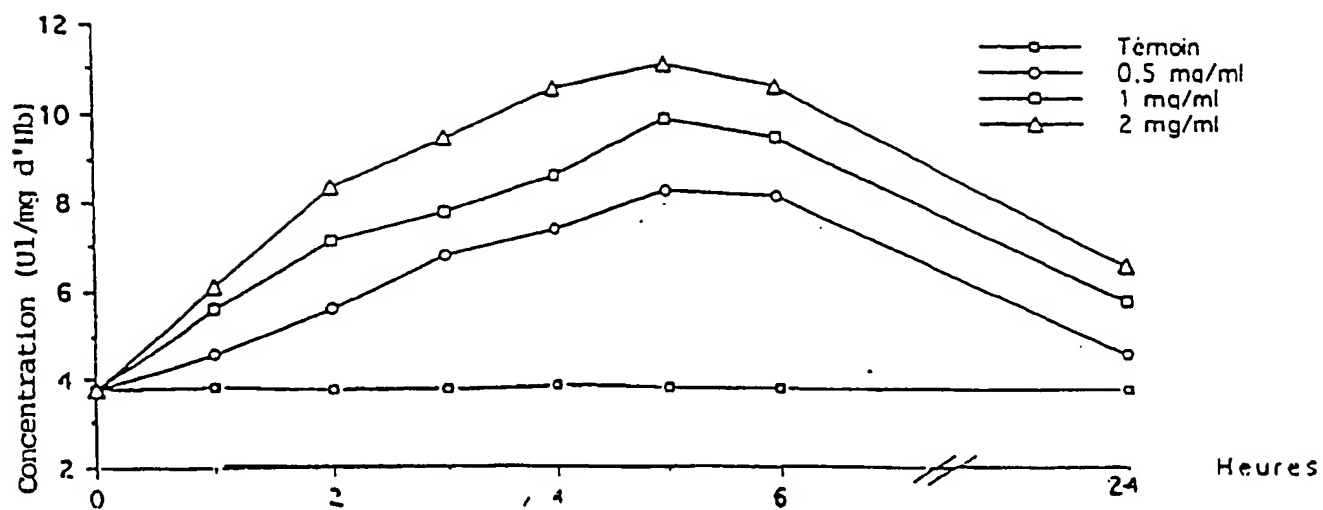


FIGURE 3

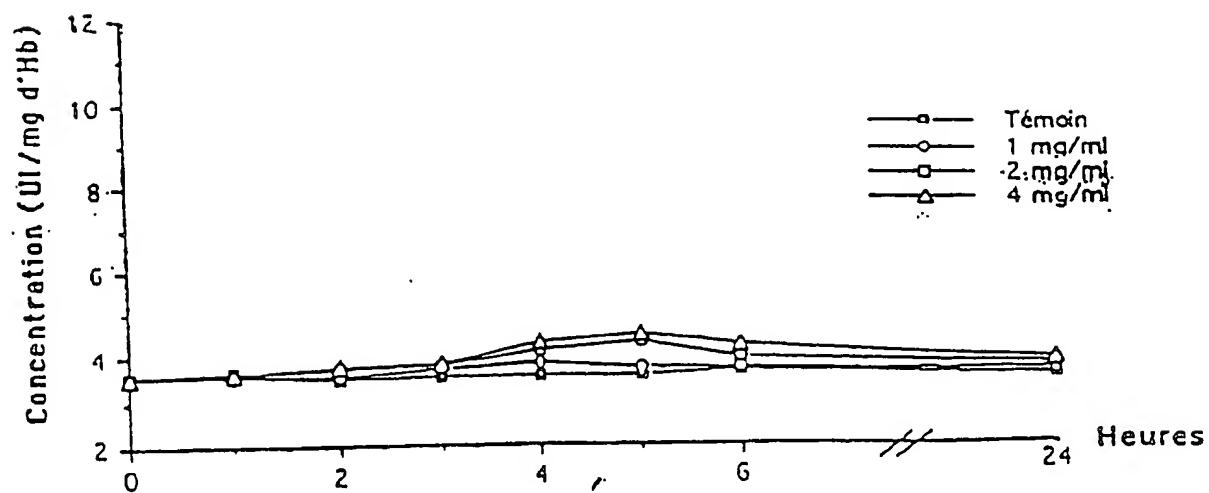


FIGURE 4

3/17

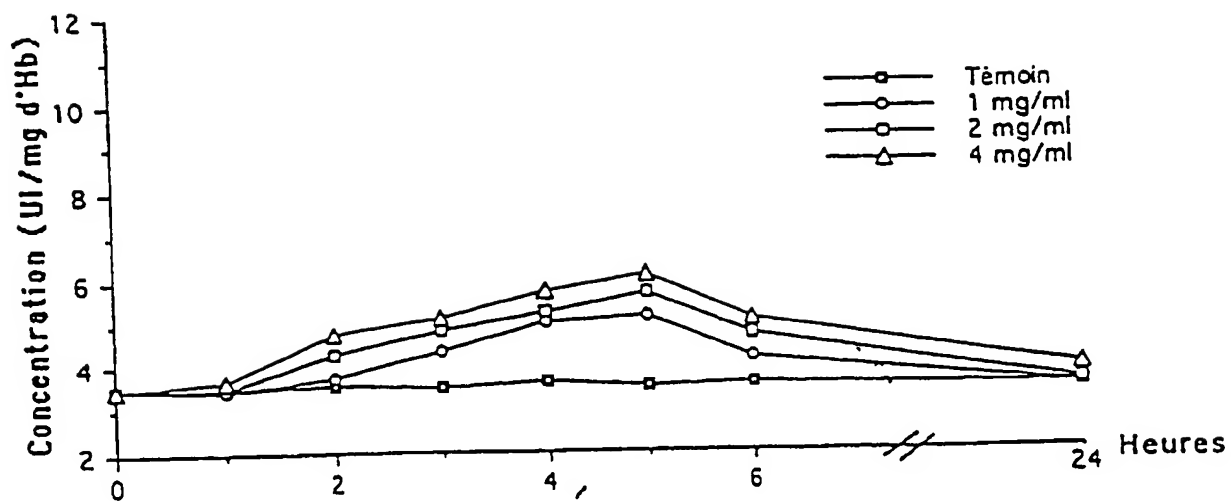


FIGURE 5

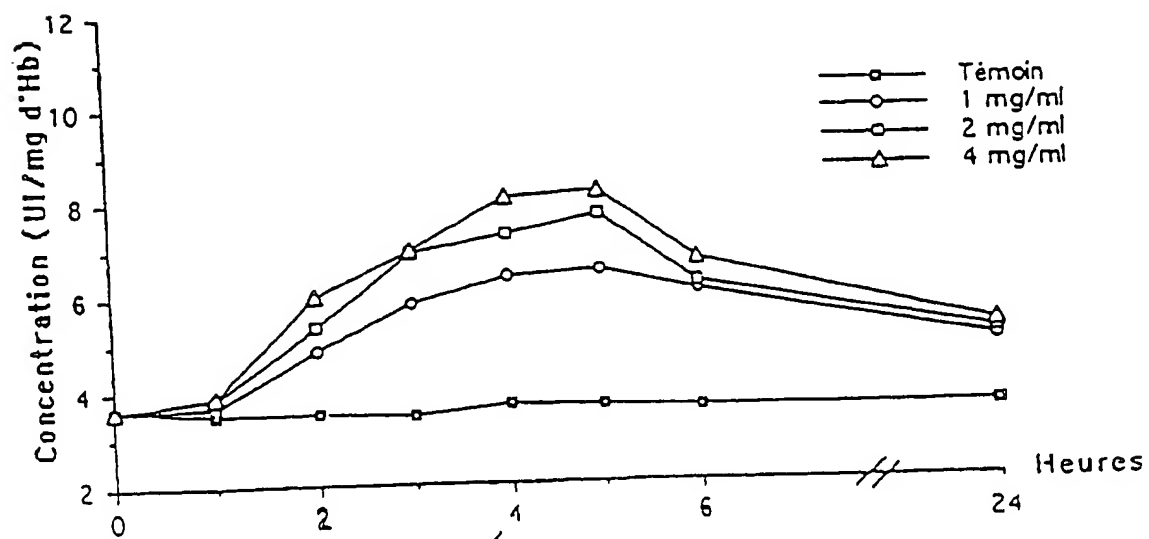


FIGURE 6

4/17

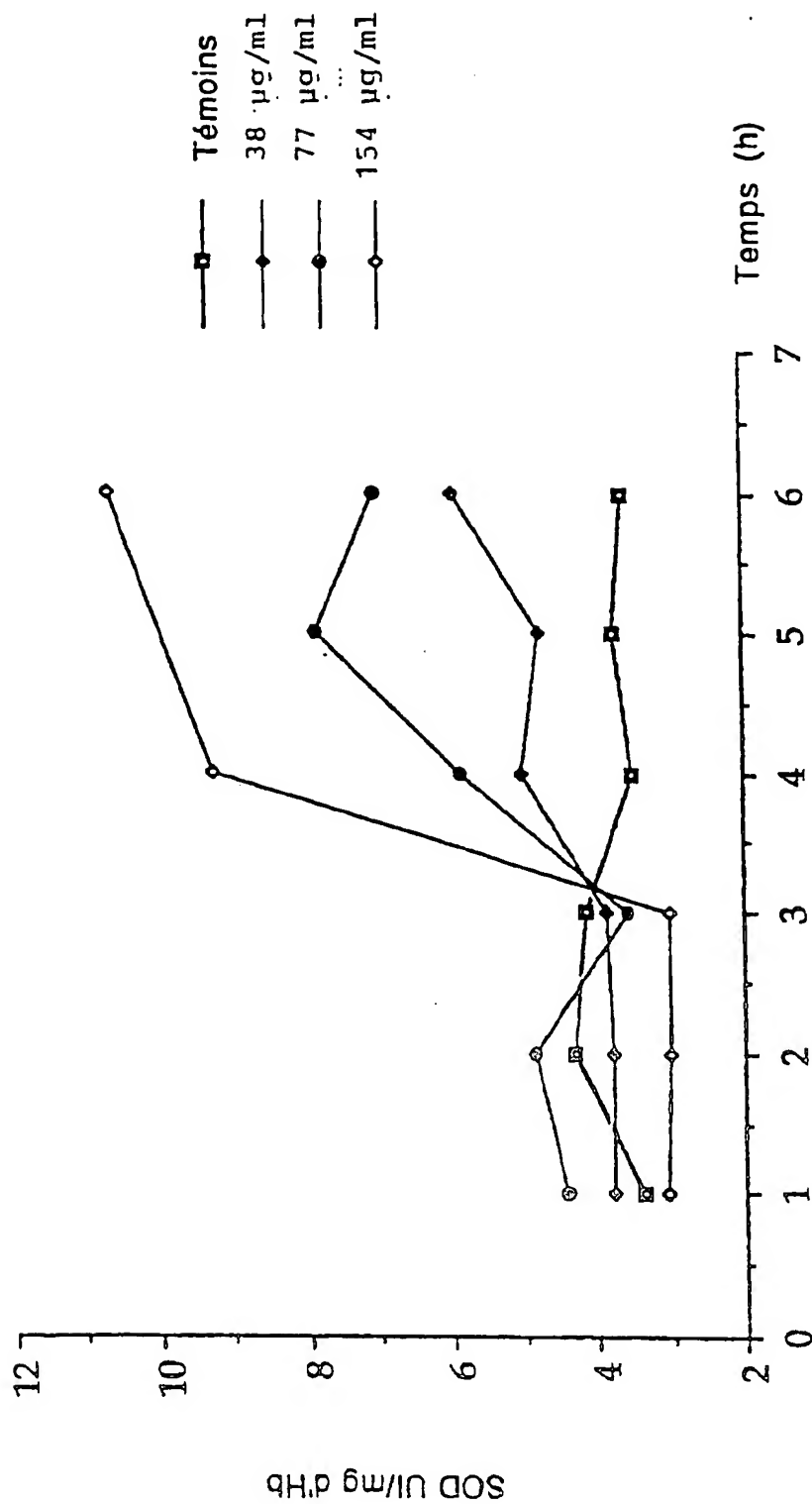


FIGURE 7

5/17

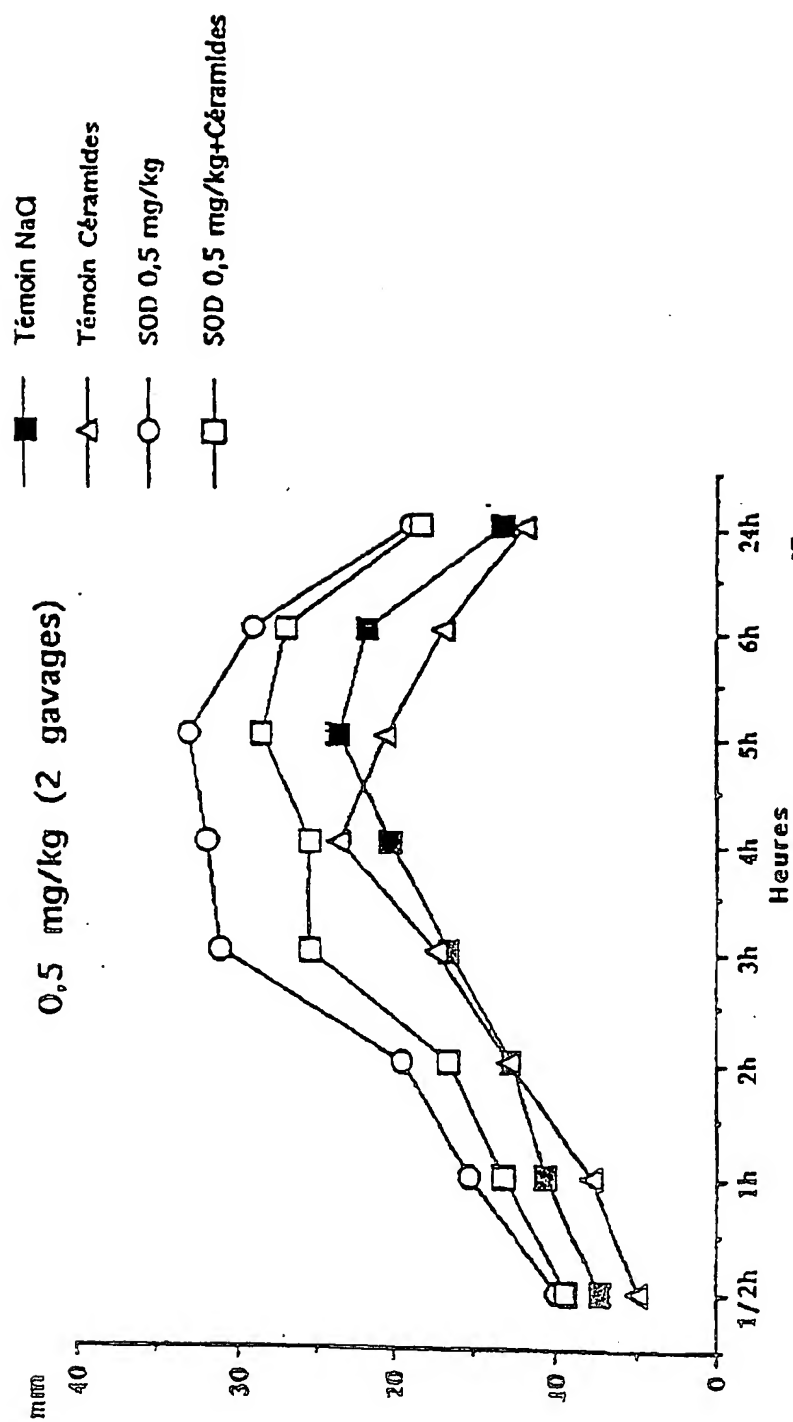


FIGURE 8

6/17

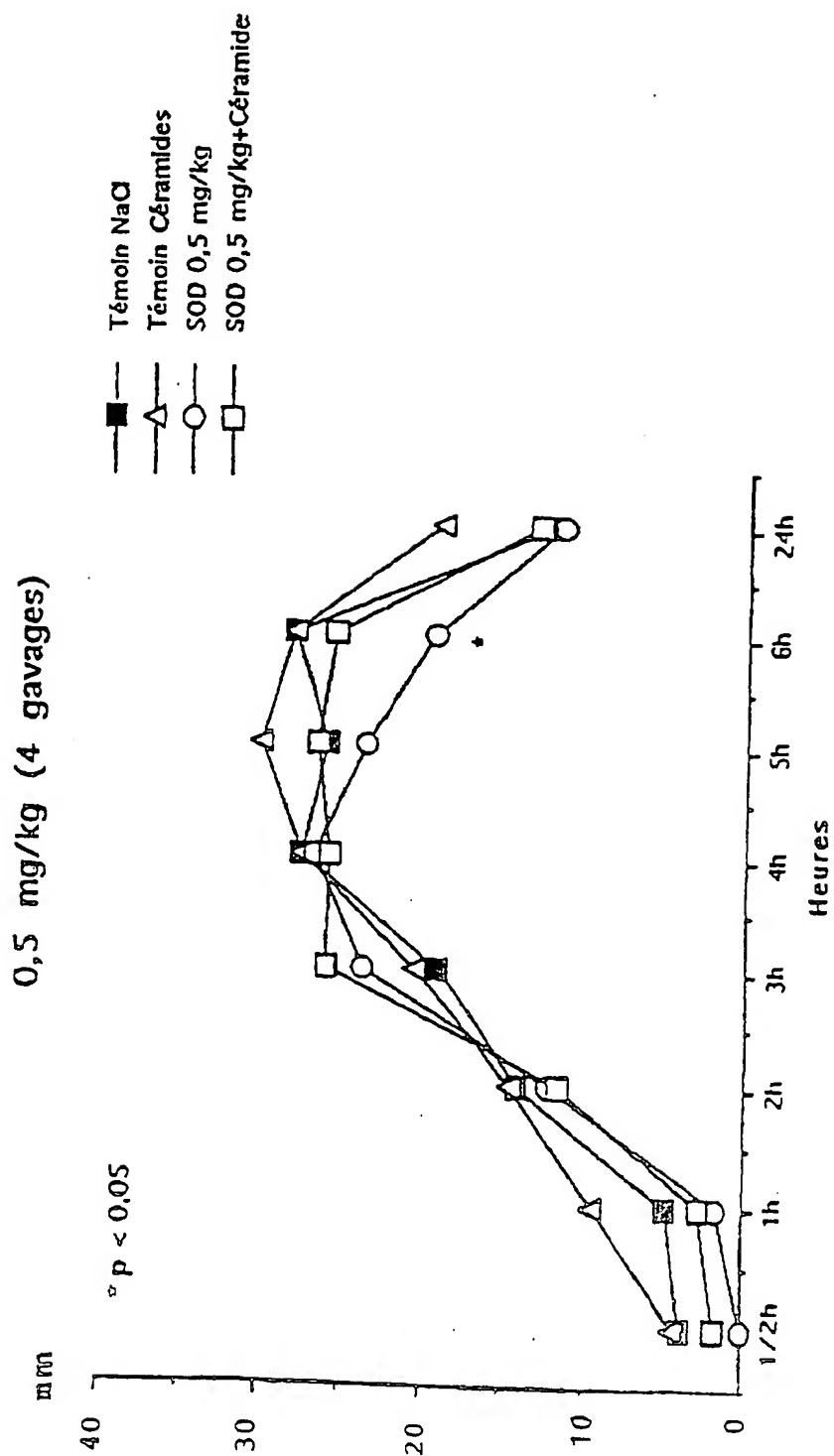


FIGURE 9

7/17

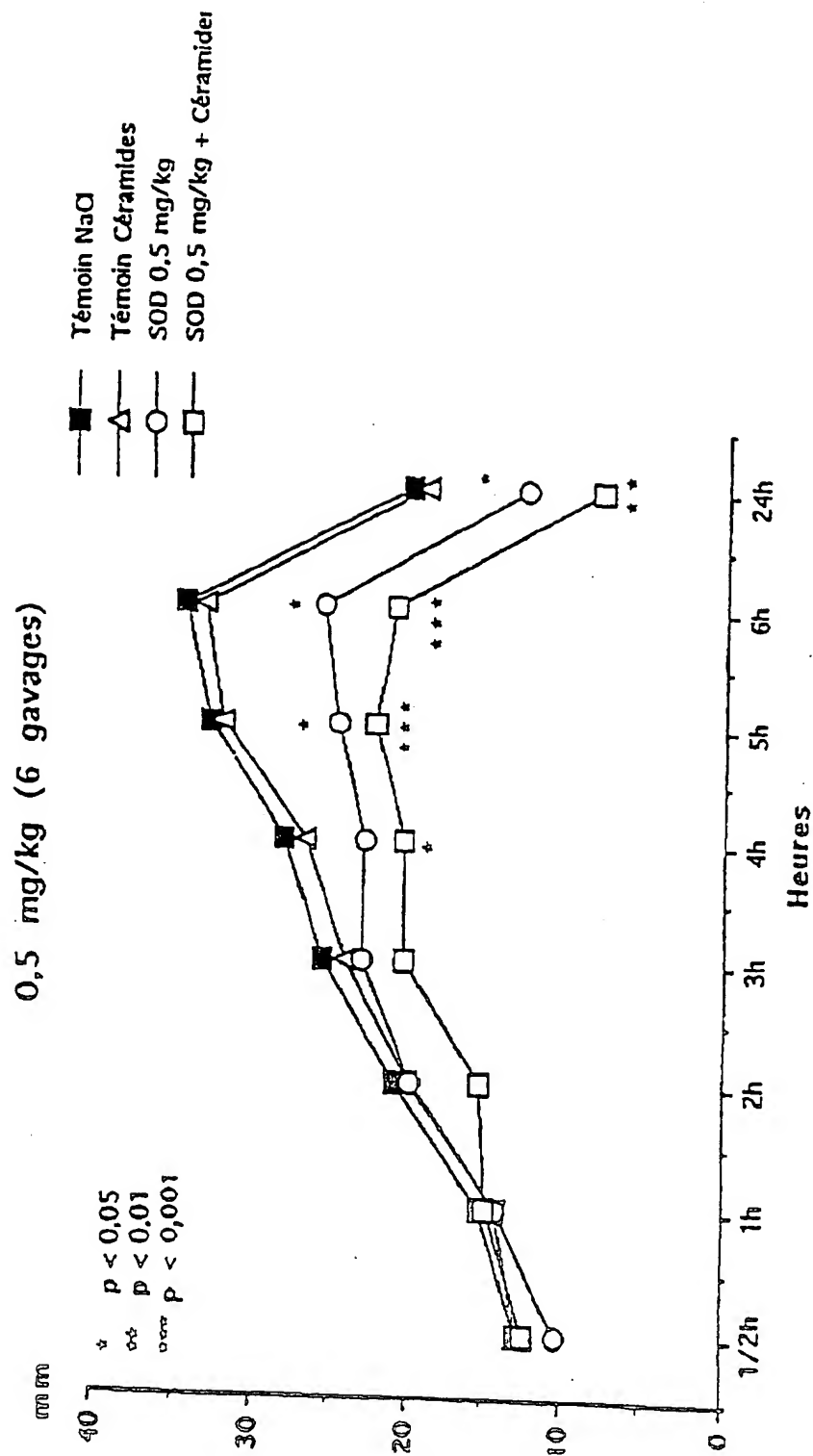


FIGURE 10

8/17

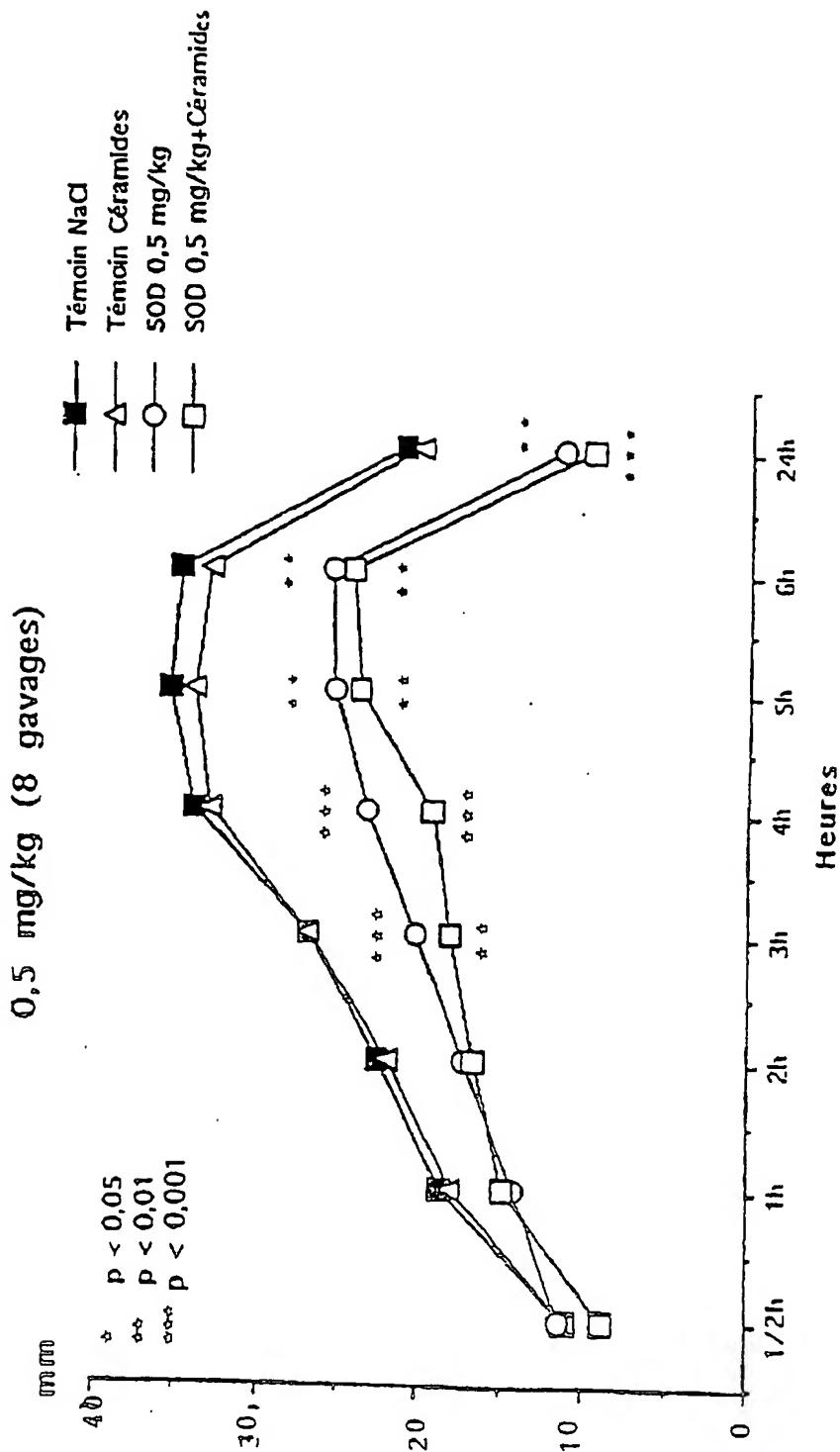


FIGURE 11

9/17

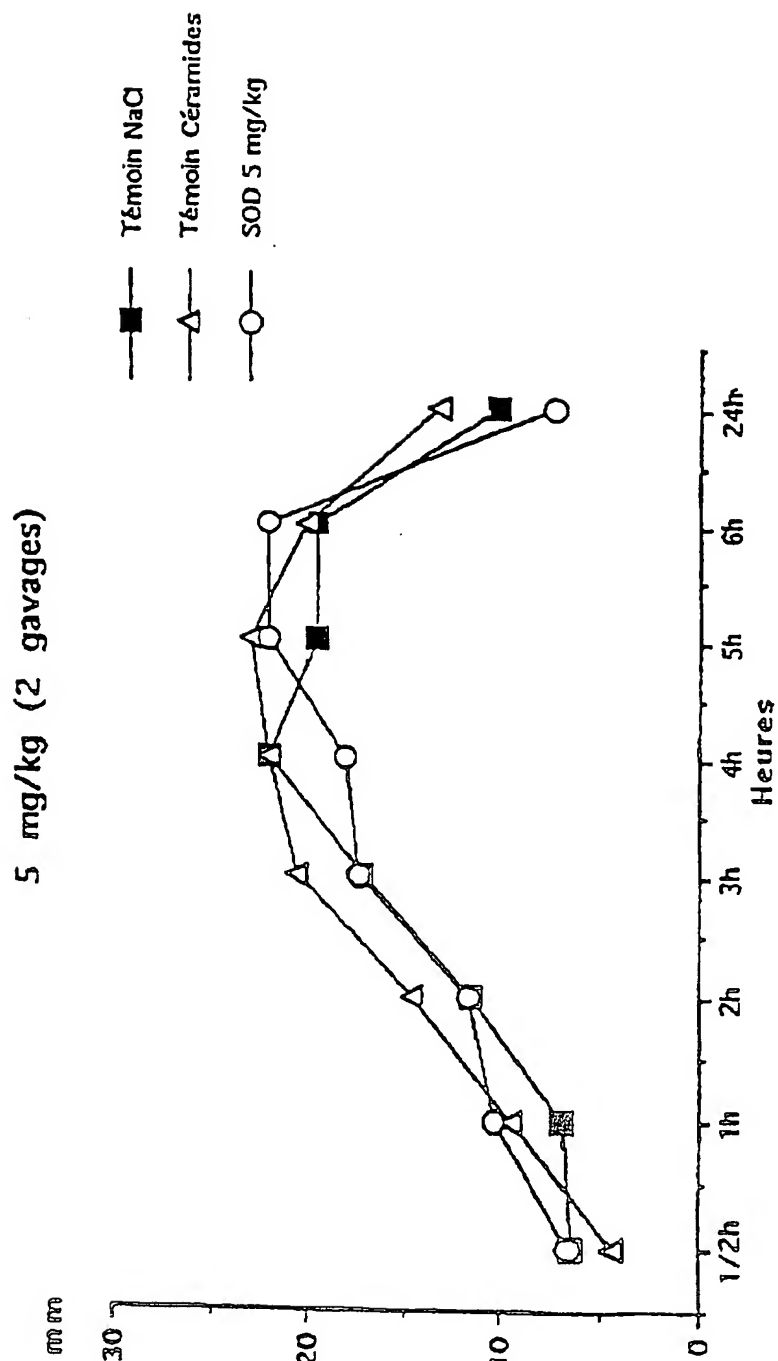


FIGURE 12

10/17

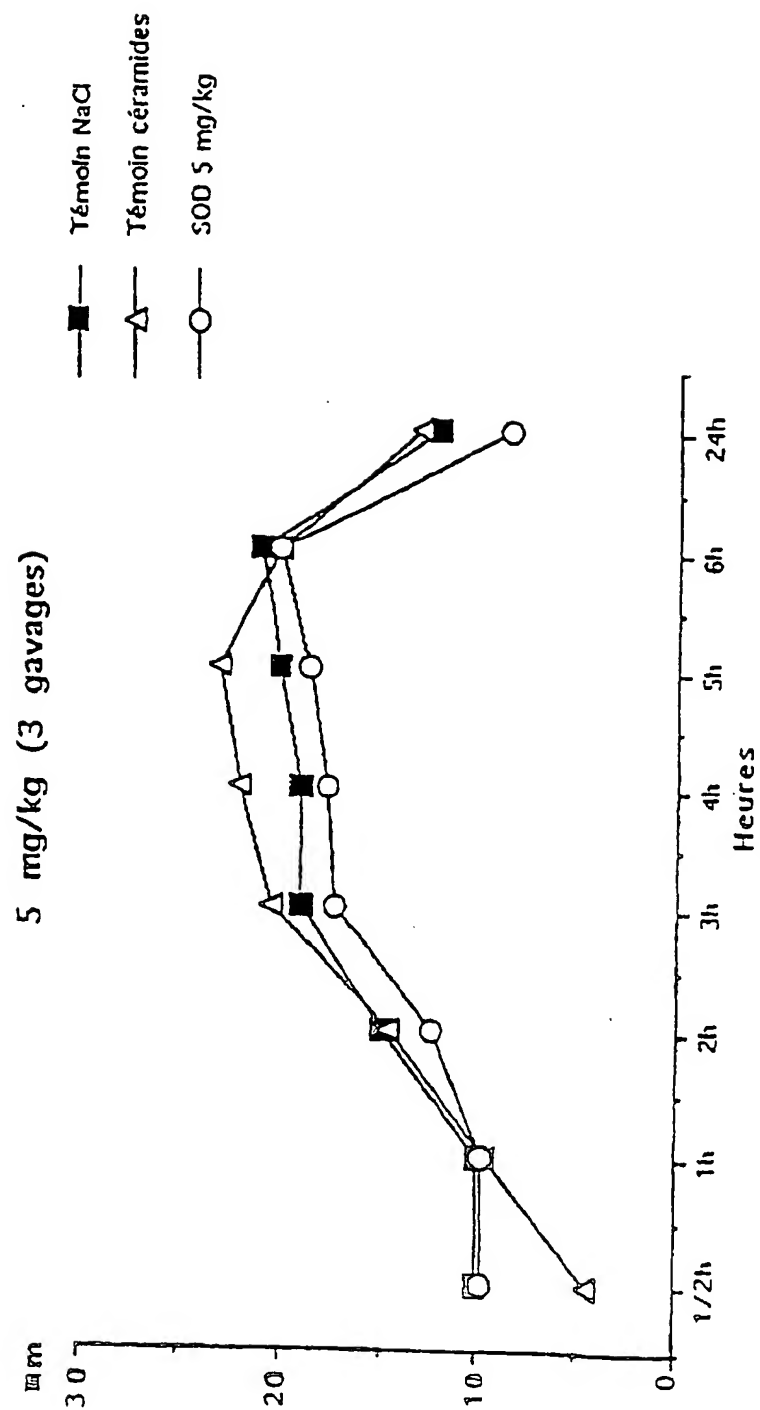


FIGURE 13

11/17

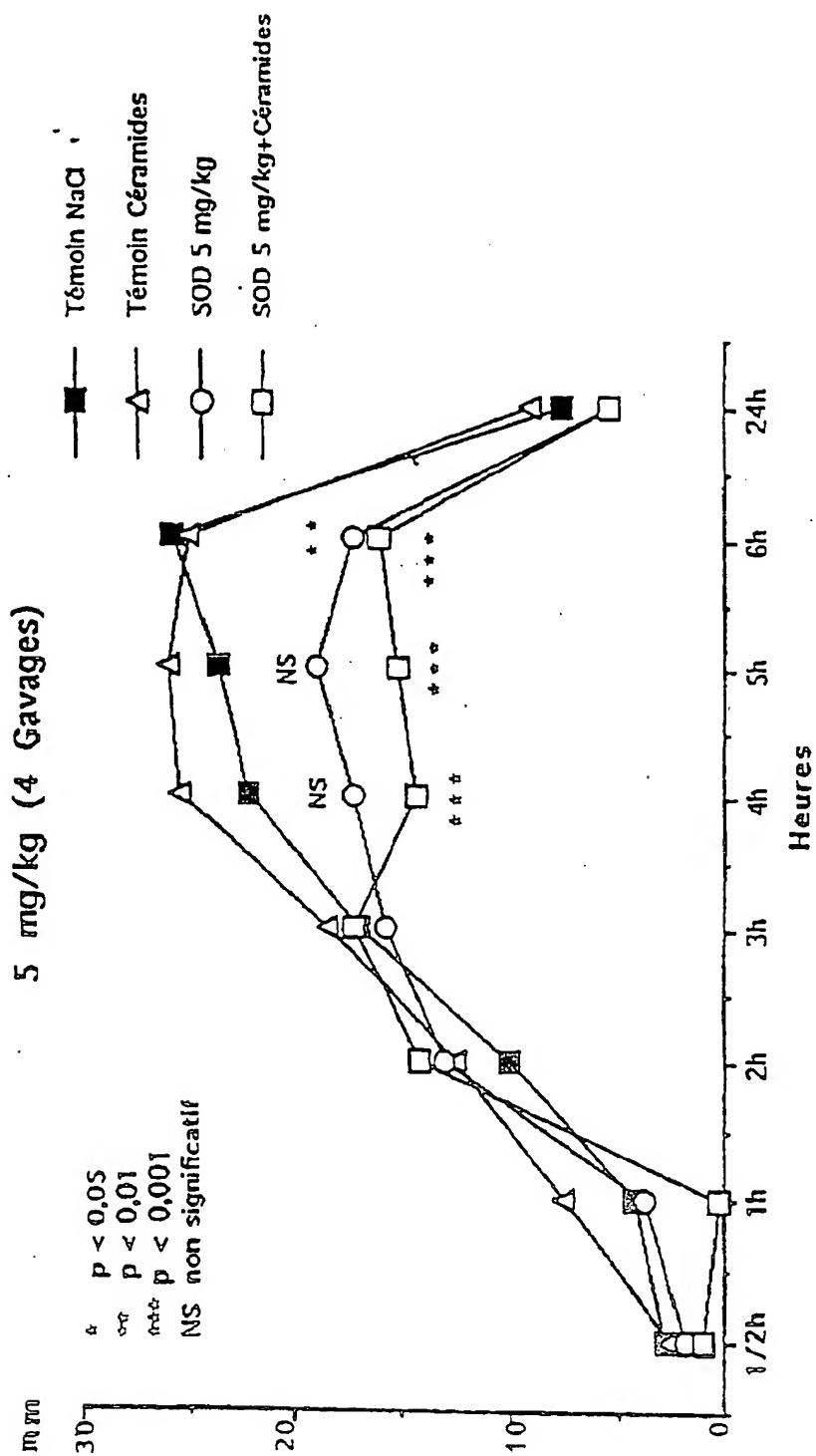


FIGURE 14

12/17

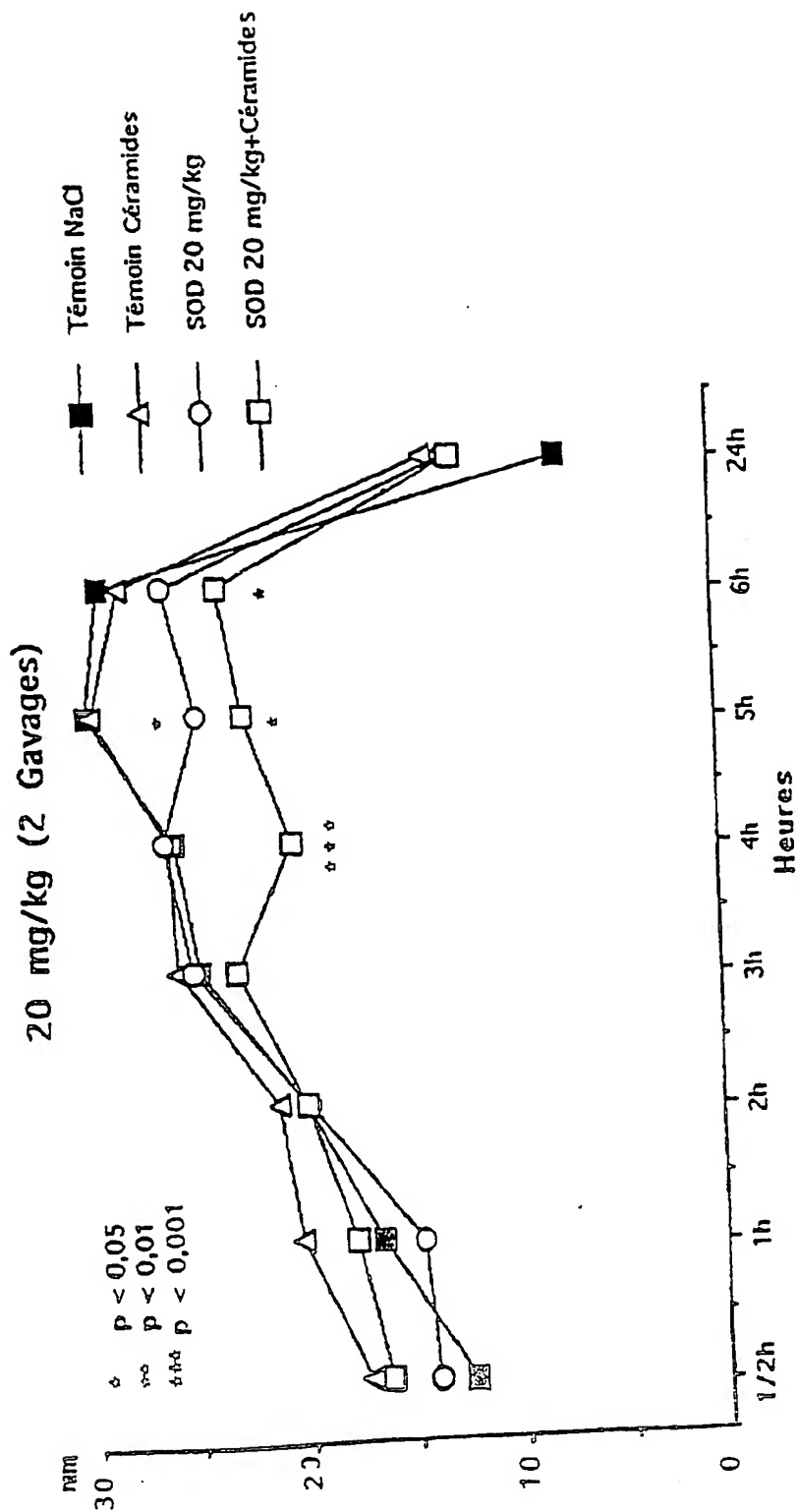


FIGURE 15

13/17

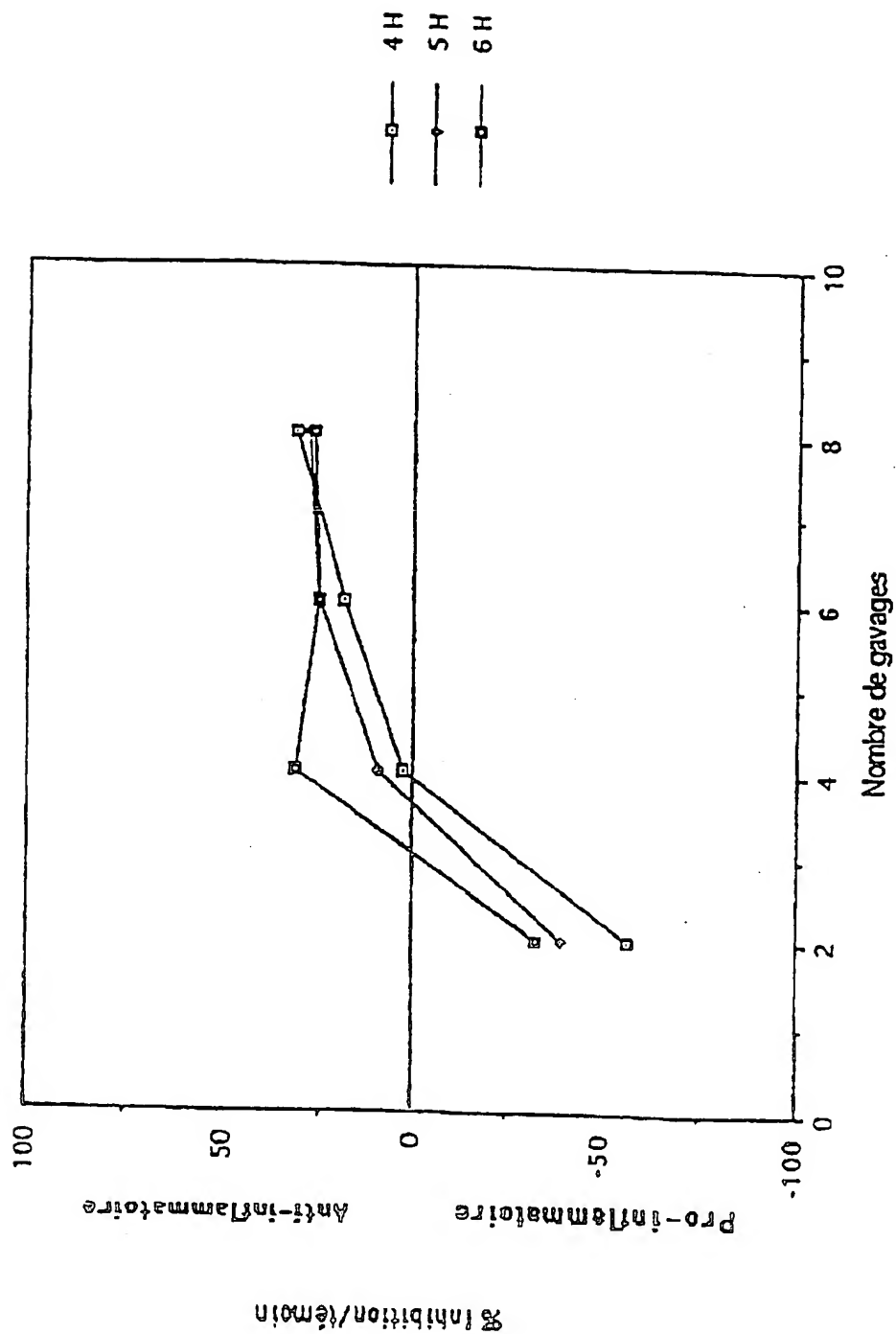


FIGURE 16

14/17

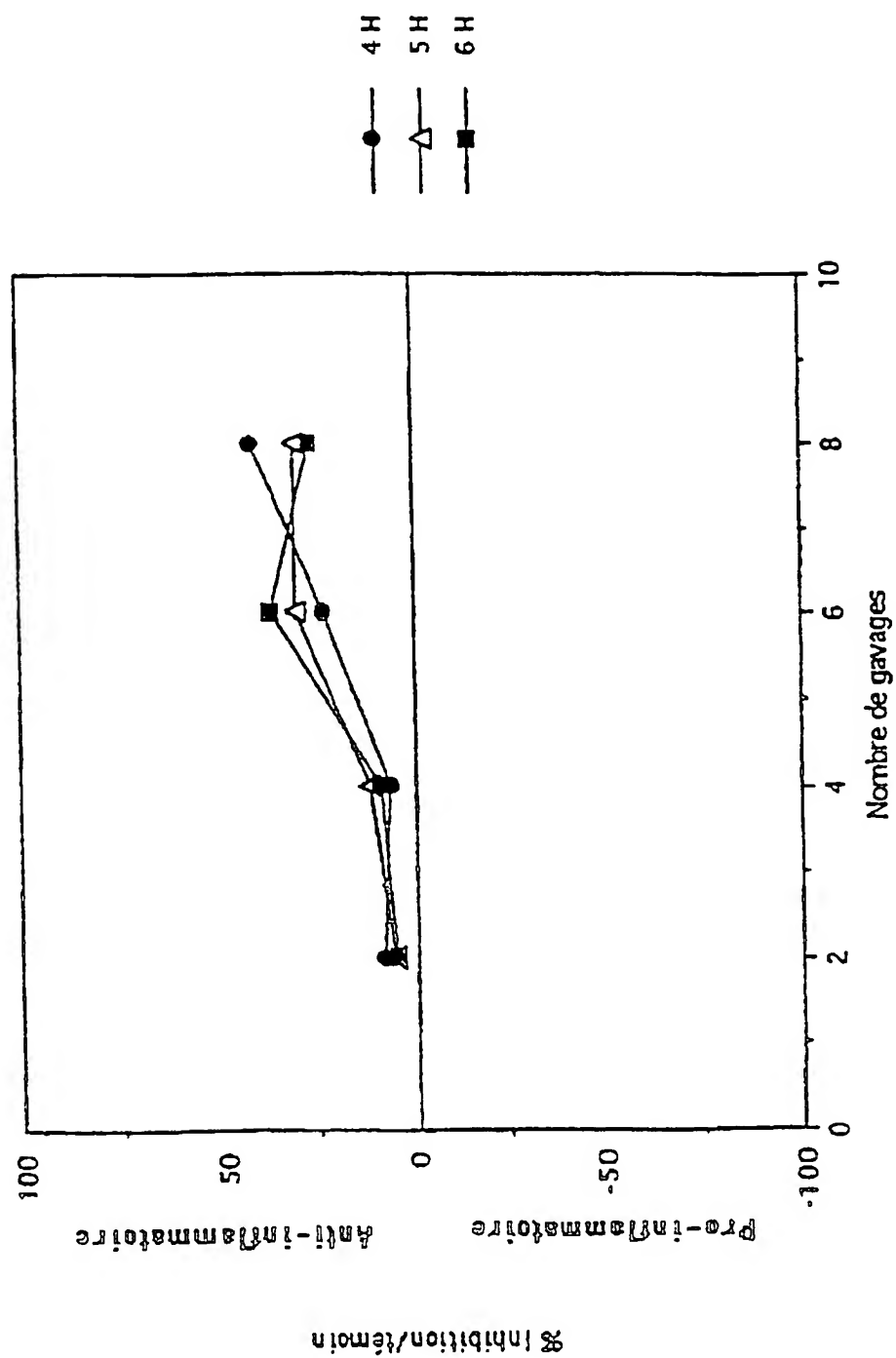


FIGURE 17

15/17

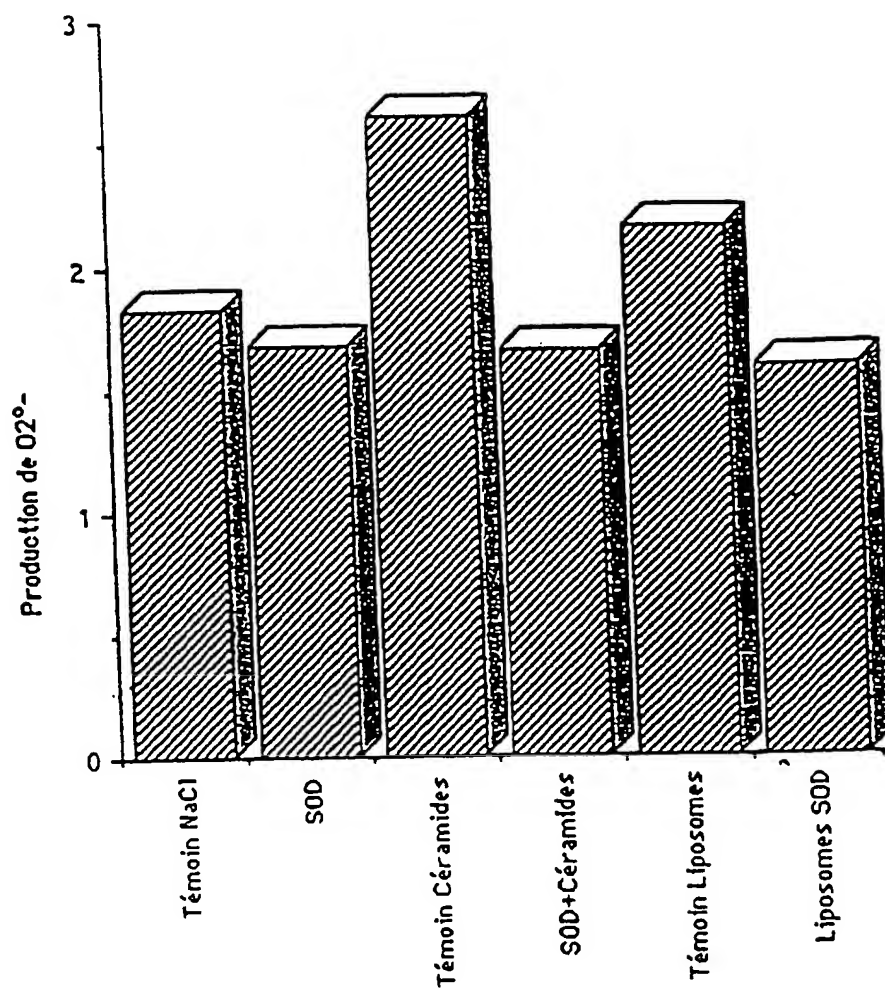


FIGURE 18

16/17

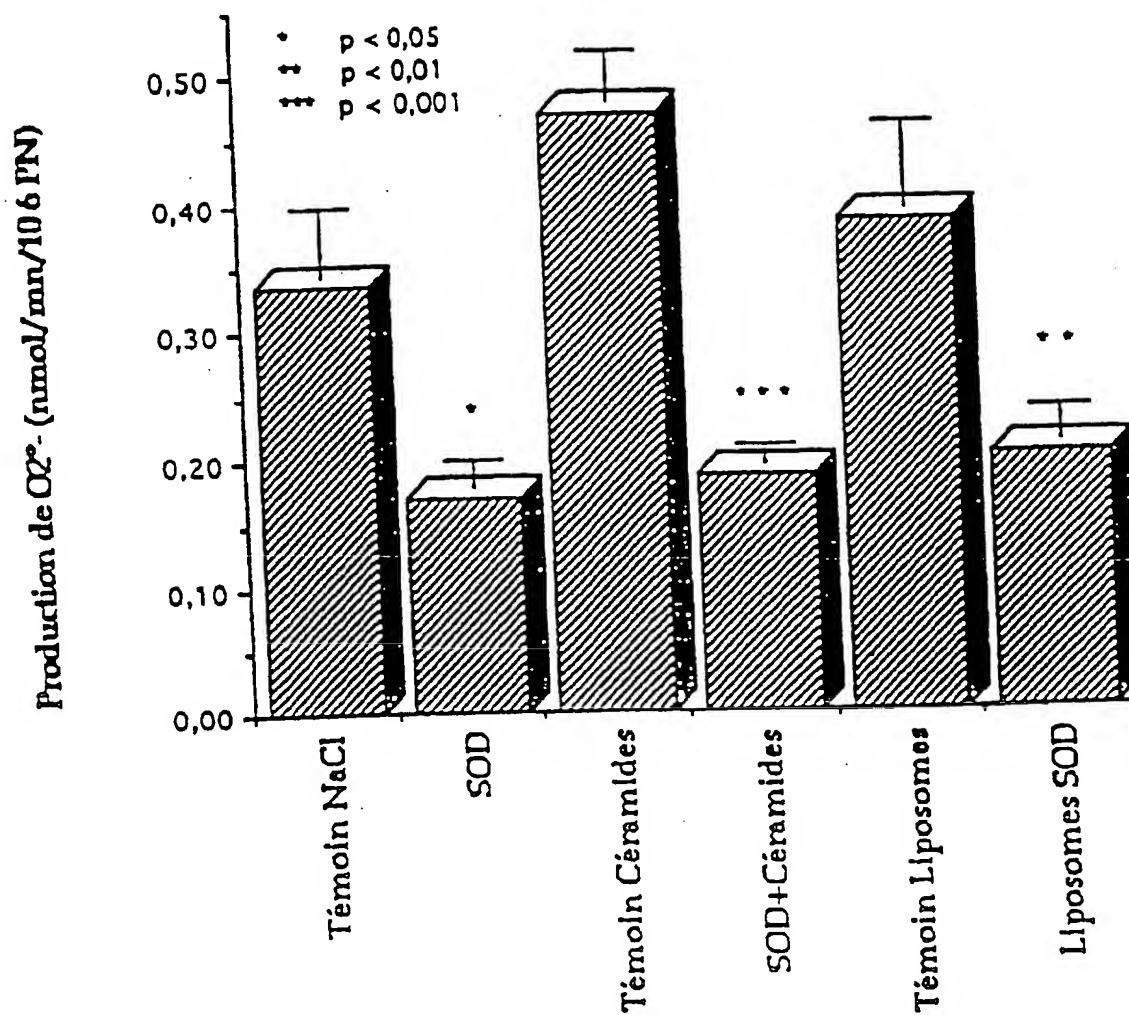


FIGURE 19

17/17

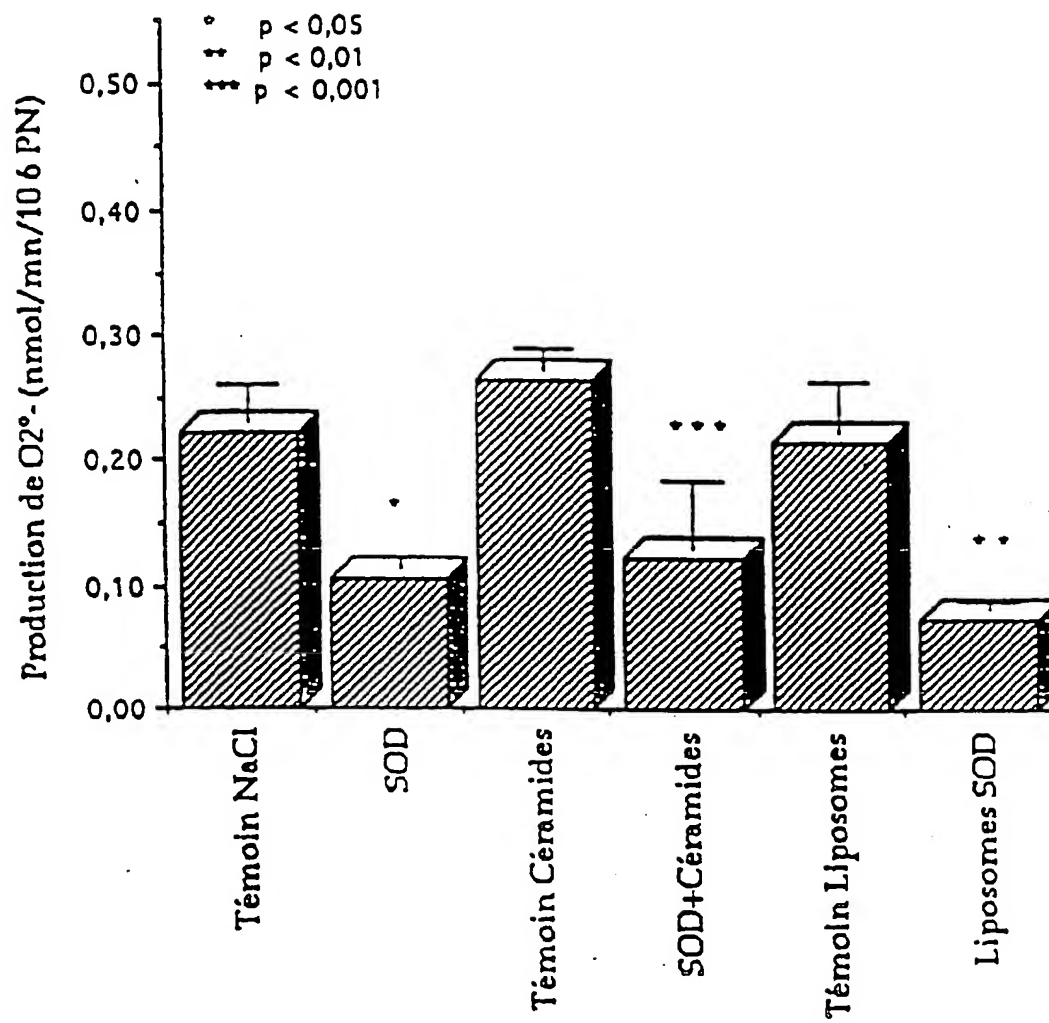


FIGURE 20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PC1/FR 96/00055

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 A61K38/44 //(A61K38/44,A61K31:23),(A61K38/44,A61K38:02)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP,A,0 292 964 (KURARAY CO. LTD) 30 November 1988 ---	
A	EP,A,0 342 620 (NIPPON KAYAKU KABUSHIKI KAISHA) 23 November 1989 ---	
A	DATABASE WPI Week 9223 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 92-189207 & JP,A,04 124 122 (SHISEIDO CO. LTD) , 24 April 1992 see abstract -----	

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

*** Special categories of cited documents:**

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

Δ document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

1 April 1996

Date of mailing of the international search report

17. 04. 96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patendaan 2
NL - 2230 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tlx 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Klaver, T

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PC1/FR 96/00055

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-292964	30-11-88	AT-T- 120647	15-04-95
		DE-D- 3853493	11-05-95
		DE-T- 3853493	27-07-95
		JP-A- 1112981	01-05-89
		US-A- 5137820	11-08-92
		US-A- 5180582	19-01-93

EP-A-342620	23-11-89	JP-A- 2062829	02-03-90
		US-A- 4952409	28-08-90

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der 'e Internationale No
PLI/FR 96/00055

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 6 A61K38/44 //(A61K38/44,A61K31:23),(A61K38/44,A61K38:02)

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	EP,A,0 292 964 (KURARAY CO. LTD) 30 Novembre 1988 ---	
A	EP,A,0 342 620 (NIPPON KAYAKU KABUSHIKI KAISHA) 23 Novembre 1989 ---	
A	DATABASE WPI Week 9223 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 92-189207 & JP,A,04 124 122 (SHISEIDO CO. LTD) , 24 Avril 1992 voir abrégé -----	

☐ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités

- 'A' document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- 'E' document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- 'L' document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- 'O' document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- 'P' document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- 'T' document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- 'X' document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- 'Y' document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- 'A' document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

1 Avril 1996

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

17.04.96

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tél. (+ 31-70) 340-2040, Tlx. 31 651 epo nl,
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Klaver, T

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Doc. Internationale No

PCI/FR 96/00055

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP-A-292964	30-11-88	AT-T- 120647	15-04-95
		DE-D- 3853493	11-05-95
		DE-T- 3853493	27-07-95
		JP-A- 1112981	01-05-89
		US-A- 5137820	11-08-92
		US-A- 5180582	19-01-93

EP-A-342620	23-11-89	JP-A- 2062829	02-03-90
		US-A- 4952409	28-08-90
